

Title	Molecular cloning of murine BST-1 having homology with CD38 and Aplysia ADP-ribosyl cyclase
Author(s)	伊藤, 素行
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40721
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について /a> をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	伊 藤 素 行
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 7 0 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成10年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科病理系専攻
学 位 論 文 名	Molecular cloning of murine BST-1 having homology with CD38 and <i>Aplysia</i> ADP-ribosyl cyclase (CD38 およびアメフラシ環状 ADP リボース合成酵素とホモロジーを持つマウス BST-1 cDNA のクローニング)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 平野 俊夫 (副査) 教 授 宮坂 昌之 教 授 菊谷 仁

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

慢性関節リウマチ (RA) における免疫学的異常の一つに、多クローン性B細胞の異常な活性化に基づく高 γ グロブリン血症やリウマチ因子などの自己抗体出現が挙げられる。近年、骨髓微小環境におけるBリンパ球初期発生が骨髓間質細胞の産生するサイトカインや接着分子等の間質細胞表面分子によって制御されていることが明らかにされてきた。我々は疾患における骨髓微小環境の異常を解析する過程で RA 患者骨髓より樹立した骨髓間質細胞株では、正常人由来の骨髓間質細胞株と比べてマウスブレB細胞株 DW34 の増殖を支持する機能が亢進していることを見いだした。さらに RA 由来の間質細胞株で発現が亢進している分子として新規膜蛋白質 BST-1 (Bone marrow stromal cell antigen1) の cDNA をクローニングし、線維芽細胞株 BALB/3T3 での強制発現実験により、ブレB細胞増殖支持能に関与することを証明した。以上の研究は、ヒト BST-1 の遺伝子を用いて行われたが、in vivo での BST-1 の機能と自己免疫疾患の関わりを解析するには、疾患モデル動物などを用いることができ、より詳細な解析方法が確立しているマウスの系が有意と考え、マウス BST-1 の cDNA クローニングを行った。

【方法ならびに成績】

マウス BST-1 のクローニングはヒト BST-1 の cDNA をプローブとし、マウス pre-B 細胞株 18.81 より調製した cDNA ライブラリーよりクロスハイブリダイズするクローンを得た。得られた cDNA の塩基配列を決定したところ、ヒト BST-1 と比較して 5' 側の領域が欠落していたため、5' RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法を用いて、5' 側領域をクローニングした。得られた最長の cDNA の塩基配列は1265塩基対からなり、予想されるアミノ酸配列は311 残基よりなることが分かった。マウス BST-1 はヒト BST-1 と同様に N 末にジグナルペプチド配列と思われる疎水性領域を持ち、C 末側には GPI 結合認識配列を有する膜蛋白と考えられた。

マウス BST-1 のアミノ酸配列をヒト BST-1 と比較すると、71%の相同性があり、四つの糖鎖結合の可能なアミノ酸配列が保存されていた。また BST-1 はヒト及びマウスの CD38 リンパ球抗原と約30%、アメフラシ環状 ADP リボース合成酵素と25%の相同性を有していた。BST-1, CD38, アメフラシ環状 ADP リボース合成酵素のすべてで10個のシステイン残基が完全に保存されており、その重要性が示唆された。

マウス BST-1 遺伝子のサザンブロットを自己免疫疾患モデルマウスを含む種々のマウスで行った。その結果、

Balb/c, NZB, DBA/2 のグループと C57BL/6, A/J, CBA/N, NZW, MRL/lpr, BXSB のグループに分かれる 2 つの対立遺伝子が存在することが分かった。さらに、この遺伝子多型が BST-1 遺伝子の 5' 側領域に存在することから、自己免疫疾患モデルマウスを含む各系統のマウスで BST-1 遺伝子の発現をノーザンブロットで比較したが、有意差は見られなかった。

次に BST-1 遺伝子の発現をノーザンブロットにて検出した。BST-1 遺伝子の mRNA は 2.5kb.p と 1.3kb.p の 2 種類が検出され、得られた cDNA は後者に相当すると考えられた。各臓器での発現を検討すると、骨髄、肺、腎臓、脾臓、心臓、胸腺で発現が見られ、脳、肝臓、骨格筋では見られなかった。細胞株での発現は骨髄系細胞、プレ B 細胞などでみられ、弱く発現する swiss3T3 細胞を除いて調べたかぎりの線維芽細胞株、間質細胞株、T 細胞株ではその発現は見られなかった。

【総括】

マウス BST-1 はヒト BST-1 とアミノ酸レベルでよく保存されており、その組織における発現にも共通性がみられたことから、マウス BST-1 もヒト BST-1 と類似した機能を持つことが推測された。種々のマウス間で BST-1 遺伝子の 5' 側領域に遺伝子多型が認められたが、自己免疫疾患モデルマウス特異的な発現異常は見られなかった。その後、生体内における BST-1 の機能を明らかにするためにノックアウトマウスを作成し、表現形質および機能異常を解析した。その結果、脾臓白髄質やパイエル板などの細網状間質細胞に発現される BST-1 がそれぞれ、胸腺非依存性 2 型抗原に対する IgG3 クラスの抗体産生や経口免疫後の粘膜局所での IgA 産生において重要な役割を担っていることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

ヒトの慢性関節リウマチ由来の間質細胞株で発現が亢進している分子としてクローニングされた BST-1 は CD38 リンパ球抗原と 30%、アメフラシ環状 ADP リボース合成酵素と 25% の相同性を有しており、環状 ADP リボース合成および水解活性をもつ細胞外酵素である。線維芽細胞株 BALB/3T3 でヒト BST-1 を強制発現する *in vitro* の実験により、BST-1 がプレ B 細胞増殖支持能に関与することが明らかとなっている。さらに BST-1 の *in vivo* での機能や自己免疫疾患との関わりを解析するには、疾患モデル動物などを用いることができ、より詳細な解析方法が確立しているマウスの系が有利である。申請者はこの観点からマウス BST-1 の cDNA クローニングを行い、その組織、細胞株における発現や、種々のマウス間で BST-1 遺伝子の 5' 側領域に遺伝子多型が存在することを初めて報告した。クローニングにより明らかになったマウス BST-1 はヒト BST-1 とアミノ酸レベルでよく保存されており、その組織における発現にも共通性がみられたことから、マウス BST-1 もヒト BST-1 と類似した機能を持つことが推測された。申請者主論文で報告したマウス BST-1 の cDNA クローニングは、その後の申請者による BST-1 ノックアウトマウスの作製やマウス BST-1 の詳細な発現部位の解析など、*in vivo* における BST-1 の機能の解析を進める上での礎となる重要な知見であった。よって学位の授与に値すると考えられる。